



**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

VERIFICATION OF TRANSLATION

Patent Application No.

198 19 846.9

I, Ursula Scherz
of Schlesierstr. 8
81669 München

am the translator of the documents attached and I state
that the following is a true translation to the best of
my knowledge and belief of German Patent
Application No. 198 19-846.9

DATED this 5th day of March 2001

Signature of translator

Ursula Scherz



Certified translation of a priority document

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent
Application**

File No.: 198 19 846.9

Date of Filing: May 5, 1998

Applicant/Patentee: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/Germany

Title: Multivalent Antibody Constructs

IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N

**The attached sheets are a true and exact reproduction of
the original documents of this patent application.**

München, February 8, 2001

German Patent and Trademark Office

The President

Seal:

by order

German Patent and

(signature)

Trademark Office

Wehner

Applicant: Deutsches Krebsforschungszentrum
Attorney's File: K 2534 - hu /A

Multivalent Antibody Constructs

The present invention relates to multivalent F_v antibody constructs, expression plasmids which code for them, and a method for producing the F_v antibody constructs as well as the use thereof.

Natural antibodies are dimers and are therefore referred to as bivalent. They have four variable domains, namely two V_H domains and two V_L domains. The variable domains serve as binding sites for an antigen, a binding site being formed from a V_H domain and a V_L domain. Natural antibodies recognize one antigen each, so that they are also referred to as monospecific. Furthermore, they also have constant domains which add to the stability of the natural antibodies. On the other hand, they are also co-responsible for undesired immune responses which result when natural antibodies of various animal species are administered mutually.

In order to avoid such immune responses, antibodies are constructed which lack the constant domains. In particular, these are antibodies which only comprise the variable domains. Such antibodies are designated F_v antibody constructs. They are often available in the form of single-chain monomers paired with one another.

However, it showed that F_v antibody constructs only have little stability. Therefore, their usability for therapeutic purposes is strongly limited.

Thus, it is the object of the present invention to provide an antibody by means of which undesired immune responses can be avoided. Furthermore, it shall have a stability which makes it usable for therapeutic uses.

According to the invention this is achieved by the subject matters defined in the claims.

Therefore, the subject matter of the present invention relates to a multivalent F_v antibody construct which has great stability. Such a construct is suitable for diagnostic and therapeutic purposes.

The present invention is based on the applicant's insights that the stability of an F_v antibody construct can be increased if it is present in the form of a single-chain dimer where the four variable domains are linked with one another via three peptide linkers. The applicant also recognized that the F_v antibody construct folds with itself when the middle peptide linker has a length of about 10 to 30 amino acids. The applicant also recognized that the F_v antibody construct folds with other F_v antibody constructs when the middle peptide linker has a length of about up to 10 amino acids so as to obtain a multimeric, i.e. multivalent, F_v antibody construct. The applicant also realized that the F_v antibody construct can be multi-specific.

According to the invention the applicant's insights are utilized to provide a multi-valent F_v antibody construct

which comprises at least four variable domains which are linked with one another via peptide linkers 1, 2 and 3.

The expression "F_v antibody construct" refers to an antibody which has variable domains but no constant domains.

The expression "multivalent F_v antibody construct" refers to an F_v antibody which has several, but at least four, variable domains. This is achieved when the single-chain F_v antibody construct folds with itself so as to give four variable domains, or folds with other single-chain F_v antibody constructs. In the latter case, an F_v antibody construct is given which has 8, 12, 16, etc., variable domains. It is favorable for the F_v antibody construct to have four or eight variable domains, i.e. it is bivalent or tetravalent (cf. Fig. 1). Furthermore, the variable domains may be equal or differ from one another, so that the antibody construct recognizes one or several antigens. The antibody construct preferably recognizes one or two antigens, i.e. it is monospecific and bispecific, respectively. Examples of such antigens are proteins CD19 and CD3.

The expression "peptide linkers 1, 3" refers to a peptide linker adapted to link variable domains of an F_v antibody construct with one another. The peptide linker may contain any amino acids, the amino acids glycine (G), serine (S) and proline (P) being preferred. The peptide linkers 1 and 3 may be equal or differ from each other. Furthermore, the peptide linker may have a length of about 0 to 10 amino acids. In the former case, the peptide linker is only a peptide bond from the COOH residue of one of the variable domains and the NH₂ residue of another of the variable domains. The peptide linker preferably comprises the amino acid sequence GG.

The expression "peptide linker 2" refers to a peptide linker adapted to link variable domains of an F_v antibody construct with one another. The peptide linker may contain any amino acids, the amino acids glycine (G), serine (S) and proline (P) being preferred. The peptide linker may also have a length of about 3 to 10 amino acids, in particular 5 amino acids, and most particularly the amino acid sequence GGPGS, which serves for achieving that the single-chain F_v antibody construct folds with other single-chain F_v antibody constructs. The peptide linker can also have a length of about 11 to 20 amino acids, in particular 15 to 20 amino acids, and most particularly the amino acid sequence $(G_4S)_4$, which serves for achieving that the single-chain F_v antibody construct folds with itself.

An F_v antibody construct according to the invention can be produced by common methods. A method is favorable in which DNAs coding for the peptide linkers 1, 2 and 3 are ligated with DNAs coding for the four variable domains of an F_v antibody construct such that the peptide linkers link the variable domains with one another and the resulting DNA molecule is expressed in an expression plasmid. Reference is made to Examples 1 to 5. As to the expressions " F_v antibody construct" and "peptide linker" reference is made to the above explanations and, by way of supplement, to Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982.

DNAs which code for an F_v antibody construct according to the invention also represent a subject matter of the present invention. Furthermore, expression plasmids which contain such DNAs also represent a subject matter of the present invention. Preferred expression plasmids are pDISC3x19-LL,

pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, and pPIC-DISC-SL.

They were deposited with the DSMZ (*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen*) [German-type collection for micro-organisms and cells] on April 30, 1998 under DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 and DSM 12151, respectively.

Another subject matter of the present invention relates to a kit, comprising:

- (a) an F_v antibody construct according to the invention, and/or
- (b) an expression plasmid according to the invention, and
- (c) conventional auxiliary agents, such as buffers, solvents and controls.

One or several representatives of the individual components may be present.

The present invention provides a multivalent F_v antibody construct where the variable domains are linked with one another via peptide linkers. Such an antibody construct distinguishes itself in that it contains no parts which can lead to undesired immune reactions. Furthermore, it has great stability. It also enables to bind several antigens simultaneously. Therefore, the F_v antibody construct according to the invention is perfectly adapted to be used not only for diagnostic but also for therapeutic purposes. Such purposes can be seen as regards any disease, in particular a viral, bacterial or tumoral disease.

Brief description of the drawings:

Fig. 1 shows the genetic organization of an F_v antibody construct (A) according to the invention and schemes for forming a bivalent (B) or tetravalent F_v antibody construct (C). Ag: antigen; His₆: six C-terminal histidine residues; stop: stop codon (TAA); V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 2 shows the scheme for the construction of the plasmids pDISC3x19-LL and pDISC3x19-SL. c-myc: sequence coding for an epitope which is recognized by the antibody 9E1, His₆: sequence which codes for six C-terminal histidine residues; PelB: signal peptide sequence of the bacterial pectate lyase (PelB leader); rbs: ribosome binding site; Stop: stop codon (TAA); V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 3 shows a diagram of the expression plasmid pDISC3x19-LL. 6xHis: sequence which codes for six C-terminal histidine residues; bla: gene which codes for β -lactamase responsible for ampicillin resistance; bp: base pairs; c-myc: sequence coding for an epitope which is recognized by the 9E10 antibody; ColE1: origin of the DNA replication; fl-IG: intergenic region of the bacteriophage fl; Lac P/O: wt lac-operon promoter/operator; linker 1: sequence which codes for a GlyGly dipeptide linking the V_H and V_L domains; linker 2: sequence coding for a (Gly₄Ser)₄ polypeptide which links the hybrid scFv fragments; Pel-B leader: signal peptide sequence of the bacterial pectate lyase; rbs: ribosome binding site; V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 4 shows a diagram of the expression plasmid pDISC3x19-SL. 6xHis: sequence which codes for six C-terminal histidine

residues; bla: gene which codes for β -

pairs;

c-myc: sequence coding for an epitope recognized by the 9E10 antibody; ColE1: origin of DNA replication; fl-IG: intergenic region of the bacteriophage fl; Lac P/O: wt lac-operon promoter/operator; linker 1: sequence which codes for a GlyGly dipeptide which links the V_H and V_L domains; linker 3: sequence which codes for a GlyGlyProGlySer oligopeptide which links the hybrid scFv fragments; Pel-B leader: signal peptide sequence of the bacterial pectate lyase; rbs: ribosome binding site; V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 5 shows the nucleotide sequence and the amino acid sequence derived therefrom of the bivalent F_v antibody construct encoded by the expression plasmid pDIS3x19-LL. c-myc epitope: sequence coding for an epitope which is recognized by the antibody 9E10; CDR: region determining the complementarity; framework: framework region; His6 tail: sequence which codes for six C-terminal histidine residues; PelB leader: signal peptide sequence of the bacterial pectate lyase; RBS: ribosome binding site; V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 6 shows the nucleotide sequence and the derived amino acid sequence of the tetravalent F_v antibody construct encoded by the expression plasmid pDISC3x19-SL. c-myc epitope: sequence coding for an epitope which is recognized by the 9E10 antibody; CDR: region determining complementarity; framework: framework region; His6 tail: sequence coding for the six C-terminal histidine residues; PelB leader: signal peptide sequence of the bacterial pectate lyase; RBS: ribosome binding site; V_H and V_L : variable region of the heavy and light chains.

Fig. 7 shows the nucleotide sequence and the derived amino acid sequence of a connection between a gene which codes for an α -factor leader sequence and a gene coding for the tetravalent F_v antibody construct in the *Pichia* expression plasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-factor signal: leader peptide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae*- α factor secretion signal; V_H : variable region of the heavy chain. Rhombs indicate the signal cleaving sites.

Fig. 8 shows the nucleotide sequence and the derived amino acid sequence of a connection between a gene coding for an α -factor leader sequence and a gene which codes for the bivalent F_v antibody construct in the *Pichia* expression plasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-factor signal: leader peptide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae*- α factor secretion signal; V_H : variable region of the heavy chain. Rhombs show the signal cleaving sites.

The invention is explained by the below examples.

Example 1: Construction of the plasmids pDISC3x19-LL and pDISC3x19-SL for the expression of bivalent, bispecific and/or tetravalent, bispecific F_v antibody constructs in bacteria

The plasmids pHOG- α CD19 and pHOG-dmOKT3 which code for the scFv fragments derived from the hybridoma HD37 which is specific to human CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51-62) and from the hybridoma OKT3 which is specific to human CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445-453), respectively, were used for the construction of expression plasmids for a single-chain F_v antibody construct. A PCR fragment 1 of the V_H domain of anti-CD19, followed by a segment which codes for a GlyGly linker, was produced using the primers DP1, 5'-TCACACAGAATTC-TTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, and DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC (cf. Fig. 2). The PCR fragment 1 was cleaved by EcoRI and EcoRV and ligated with the EcoRI/EcoRV-linearized plasmid pHOG-dmOKT3 so as to produce the vector pHOG19-3. The PCR fragment 2 of the V_L domain of anti-CD19, followed by a segment which codes for a c-myc epitope and a hexahistidinyI tail, was produced using the primers DP3, 5'-AGCACACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAAC-TCCA, and DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG. The PCR fragment 2 was cleaved by HindIII and XbaI and ligated with the HindIII/XbaI-linearized plasmid pHOG-dmOKT3 so as to obtain the vector pHOG3-19 (cf. Fig. 2). The gene coding for the hybrid scFv-3-19 in the plasmid pHOG3-19 was amplified by means of PCR with the primers Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG and either Li-1, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCACCACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACACCACCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, for the production of a long flexible (Gly₄Ser)₄ inter-scFV linker (PCR fragment 3, cf. Fig. 2) or Li-2, 5'-TATATA-

CTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGAGCATCAGCCCCG, for the production of a short rigid GGPGS linker (PCR fragment 4, cf. Fig. 2). The expression plasmids pDISC3x19-LL and pDISC3x19-SL were constructed by ligating the NcoI/PvuII restriction fragment from pHOG19-3, comprising the vector framework and the NcoI/PvuII-cleaved PCR fragments 3 and 4, respectively (cf. Figs. 3, 4). The complete nucleotide and protein sequences of the bivalent and tetravalent F_v antibody constructs are indicated in Figs 5 and 6, respectively.

Example 2: Construction of the plasmids pPIC-DISC-LL and pPIC-DISC-SL for the expression of bivalent, bispecific and/or tetravalent, bispecific F_v antibody constructs in yeast

(A) Construction of pPIC-DISC-SL

The vector pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Netherlands) for the expression and secretion of recombinant proteins in the yeast *Pichia pastoris* was used as a starting material. It contains a gene which codes for the *Saccharomyces cerevisiae* α-factor secretion signal, followed by a polylinker. The secretion of this vector is based on the dominant selectable marker, ZeocinTM which is bifunctional in both *Pichia* and *E. coli*. The gene which codes for the tetravalent F_v antibody construct (scDia-SL) was amplified by means of PCR by the template pDISC3x19-SL using the primers 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, and pSEXBn 5'-GGTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG. The resulting PCR product was cleaved by EcoRI and XbaI and ligated in EcoRI/XbaI-linearized pPICZαA. The expression plasmid pPIC-DISC-SL was obtained. The nucleotide and protein sequences

of the tetravalent F_v antibody construct are shown in Fig. 7.

(B) Construction of pPIC-DISC-LL

The construction of pPIC-DISC-LL was carried out on the basis of pPICZ α A (Invitrogen BV, Leek, Netherlands) and pDISC3x19-LL (cf. Fig. 3). The plasmid-DNA pPICZ α A was cleaved by EcoRI. The overhanging 5'-ends were filled using a Klenow fragment of the *E. coli* DNA polymerase I. The resulting DNA was cleaved by XbaI, and the large fragment comprising the pPIC vector was isolated. Analogous thereto the DNA of pDISC3x19-LL was cleaved by NcoI and treated with a Klenow fragment. Following the cleavage using XbaI a small fragment, comprising a gene coding for the bivalent F_v antibody, was isolated. Its ligation with a pPIC-derived vector-DNA resulted in the plasmid pPIC-DISC-LL. The nucleotide and protein sequences of the bivalent F_v antibody construct are shown in Fig. 8.

Example 3: Expression of the tetravalent and/or bivalent F_v antibody construct in bacteria

E. coli XL1-blue cells (Stratagene, La Jolla, CA) which had been transformed with the expression plasmids pDISC3x19-LL and pDISC3x19-SL, respectively, were cultured overnight in 2xYT medium with 50 μ g/ml ampicillin and 100 mM glucose (2xYT_{Ga}) at 37°C. 1:50 dilutions of the overnight cultures in 2xYT_{Ga} were cultured as flask cultures at 37°C while shaking with 200 rpm. When the cultures had reached an OD₆₀₀ value of 0.8, the bacteria were pelleted by 10-minute centrifugation with 1500 g at 20°C and resuspended in the same volume of a fresh 2xYT medium containing 50 μ g/ml ampicillin and 0.4 M saccharose. IPTG was added up to a

final concentration of 0.1 mM, and the growth was continued at room temperature (20-22°C) for 18 - 20 h. The cells were harvested by 10-minute centrifugation with 5000 g at 4°C. The culture supernatant was held back and stored on ice. In order to isolate the soluble periplasmic proteins, the pelleted bacteria were resuspended in 5 % of the initial volume of ice-cold 50 mM Tris-HCl, 20 % saccharose, 1 mM EDTA, pH 8.0. Following 1 hour of incubation on ice with occasional stirring the spheroplasts were centrifuged with 30,000 g at 4°C for 30 minutes, the soluble periplasmic extract being obtained as supernatant and the spheroplasts with the insoluble periplasmic material being obtained as pellet. The culture supernatant and the soluble periplasmic extract were combined and clarified by further centrifugation (30,000 g, 4°C, 40 min.). The recombinant product was concentrated by ammonium sulfate precipitation (final concentration 70 % saturation). The protein precipitate was obtained by centrifugation (10,000 g, 4°C, 40 min.) and dissolved in 10 % of the initial volume of 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.0. An immobilized metal affinity chromatography (IMAC) was carried out at 4°C using a 5 ml column of chelating sepharose (Pharmacia) which was charged with Cu^{2+} and had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.0 (starting buffer). The sample was loaded by passing it over the column. It was then washed with twenty column volumes of starting buffer, followed by starting buffer with 50 mM imidazole until the absorption at 280 nm of the effluent was at a minimum (about thirty column volumes). The absorbed material was eluted with 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM imidazole, pH 7.0.

The protein concentrations were determined with the Bradford dye binding test (1976, Anal. Biochem. 72, 248-254) using the Bio-Rad (Munich, Germany) protein assay kit. The

concentrations of the purified tetravalent and bivalent F_v antibody constructs were determined from the A_{280} values using the extinction coefficients $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1.96$ and 1.93 , respectively.

Example 4: Expression of the tetravalent and/or bivalent antibody construct in the yeast *Pichia pastoris*

Competent *P. pastoris* GS155 cells (Invitrogen) were electroporated in the presence of 10 μg plasmid-DNA of pPIC-DISC-LL and pPIC-DISC-SL, respectively, which had been linearized with SacI. The transformants were selected for 3 days at 30°C on YPD plates containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ZeocinTM. The clones which secreted the bivalent and/or tetravalent F_v antibody constructs were selected by plate screening using an anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Germany).

For the expression of the bivalent F_v antibody constructs and tetravalent F_v antibody constructs, respectively, the clones were cultured in YPD medium in shaking flasks for 2 days at 30°C with stirring. The cells were centrifuged resuspended in the same volume of the medium containing methanol and incubated for another 3 days at 30°C with stirring. The supernatants were obtained after the centrifugation. The recombinant product was isolated by ammonium sulfate precipitation, followed by IMAC as described above.

Example 5: Characterization of the tetravalent F_v antibody construct and bivalent F_v antibody construct, respectively,

(A) Size exclusion chromatography

An analytical gel filtration of the F_v antibody constructs was carried out in PBS using a superdex 200-HR10/30 column (Pharmacia). The sample volume and the flow rate were 200 μ l/min and 0.5 ml/min, respectively. The column was calibrated with high-molecular and low-molecular gel filtration calibration kits (Pharmacia).

(B) Flow cytometry

The human $CD3^+/CD19^-$ -acute T-cell leukemia line Jurkat and the $CD19^+/CD3^-$ B-cell line JOK-1 were used for flow cytometrie. 5×10^5 cells in 50 μ l RPMI 1640 medium (GIBCO BRL, Eggestein, Germany) which was supplemented with 10 % FCS and 0.1 % sodium azide (referred to as complete medium) were incubated with 100 μ l of the F_v antibody preparations for 45 minutes on ice. After washing using the complete medium the cells were incubated with 100 μ l 10 μ g/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in the same buffer for 45 min on ice. After a second wash cycle, the cells were incubated with 100 μ l of the FITC-labeled goat-anti-mouse-IgG (GIBCO BRL) under the same conditions as before. The cells were then washed again and resuspended in 100 μ l 1 μ g/ml propidium iodide solution (Sigma, Deisenhofen, Germany) in complete medium with the exclusion of dead cells. The relative fluorescence of the stained cells was measured using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

(C) Cytotoxicity test

The $CD19$ -expressing Burkitt lymphoma cell line Raji and Namalwa were used as target cells. The cells were incubated in RPMI 1640 (GIBCO BRL) which was supplemented with 10 %

heat-inactivated FCS (GIBCO BRL), 2 mM glutamine and 1 mM pyruvate, at 37°C in a dampened atmosphere with 7.5 % CO₂. The cytotoxic T-cell tests were carried out in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % FCS, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate and 0.05 mM 2-ME. The cytotoxic activity was evaluated using a standard [⁵¹Cr] release test; 2 x 10⁶ target cells were labeled with 200 µCi Na[⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Germany) and washed 4 times and then resuspended in medium in a concentration of 2 x 10⁵/ml. The effector cells were adjusted to a concentration of 5 x 10⁶/ml. Increasing amounts of CTLs in 100 µl were titrated to 10⁴ target cells/well or cavity in 50 µl. 50 µl antibodies were added to each well. The entire test was prepared three times and incubated at 37°C for 4 h. 100 µl of the supernatant were collected and tested for [⁵¹Cr] release in a gamma counter (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Germany). The maximum release was determined by incubation of the target cells in 10 % SDS, and the spontaneous release was determined by incubation of the cells in medium alone. The specific lysis (%) was calculated as:
$$\frac{(\text{experimental release} - \text{spontaneous release})}{(\text{maximum release} - \text{spontaneous release})} \times 100.$$

Claims

1. A multivalent F_v antibody construct having at least four variable domains which are linked with one another via the peptide linkers 1, 2 and 3.
 2. The F_v antibody construct according to claim 1, wherein the peptide linkers 1 and 3 have 0 to 10 amino acids.
 3. The F_v antibody construct according to claim 2, wherein the peptide linkers 1 and 3 have the amino acid sequence GG.
 4. The F_v antibody construct according to any of claims 1 to 3, wherein the F_v antibody construct is bivalent.
 5. The F_v antibody construct according to claim 4, wherein the peptide linker 2 has 11 to 20 amino acids.
 6. The F_v antibody construct according to claim 4 or 5, wherein the peptide linker 2 has the amino acid sequence (G₄S)₄.
 7. The F_v antibody construct according to any of claims 1 to 3, wherein the F_v antibody construct is tetravalent.
 8. The F_v antibody construct according to claim 7, wherein the peptide linker 2 has 3 to 10 amino acids.
 9. The F_v antibody construct according to claim 7 or 8, wherein the peptide linker 2 comprises the amino acid sequence GGPGS.
-

10. The F_v antibody construct according to any of claims 1 to 9, wherein the F_v antibody construct is multispecific.

11. F_v antibody construct according to claim 10, wherein the F_v antibody construct is bispecific.

12. The F_v antibody construct according to any of claims 1 to 9, wherein the F_v antibody construct is monospecific.

13. A method of producing the multivalent F_v antibody construct according to any of claims 1 to 12, wherein DNAs coding for the peptide linkers 1, 2 and 3 are ligated with DNAs coding for the four variable domains of an F_v antibody construct such that the peptide linkers link the variable domains with one another and the resulting DNA molecule is expressed in an expression plasmid.

14. Expression plasmid coding for the multivalent F_v antibody construct according to any of claims 1 to 12.

15. The expression plasmid according to claim 14, namely pDISC3x19-LL.

16. The expression plasmid according to claim 14, namely pDISC3x19-SL.

17. The expression plasmid according to claim 14, namely pPIC-DISC-LL.

18. The expression plasmid according to claim 14, namely pPIC-DISC-SL.

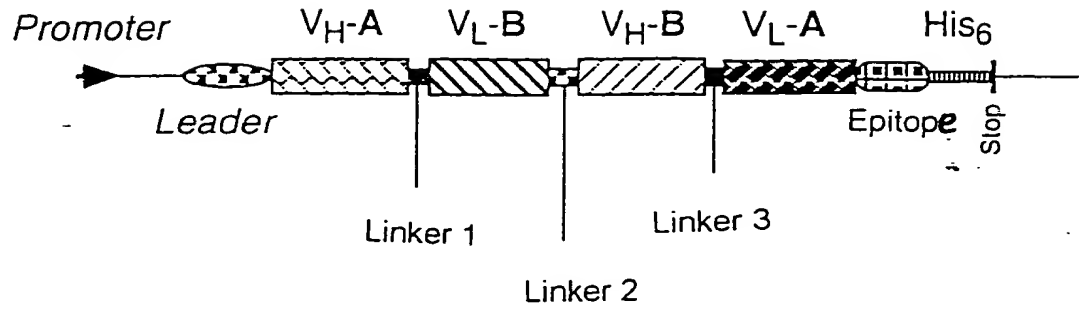
19. Use of the multivalent F_v antibody construct according to any of claims 1 to 12 for the diagnosis and/or treatment of diseases.

20. Use according to claim 19, wherein the diseases are viral, bacterial or tumoral diseases.

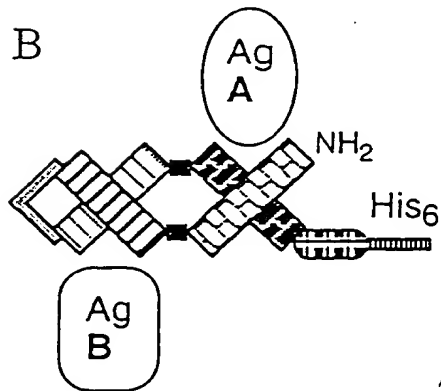
Abstract of the Disclosure**Multivalent Antibody Constructs**

The present invention relates to a multivalent F_v antibody construct having at least four variable domains which are linked with each other via the peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also concerns expression plasmids which code for such an F_v antibody construct and a method of producing the F_v antibody constructs as well as their use.

A



B



C

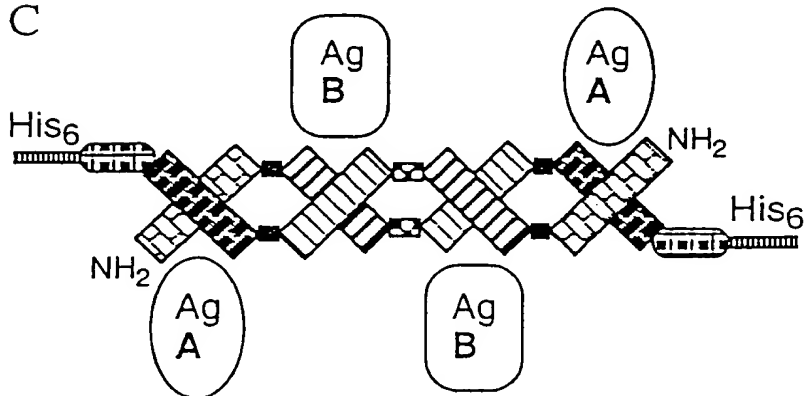


FIGURE 1

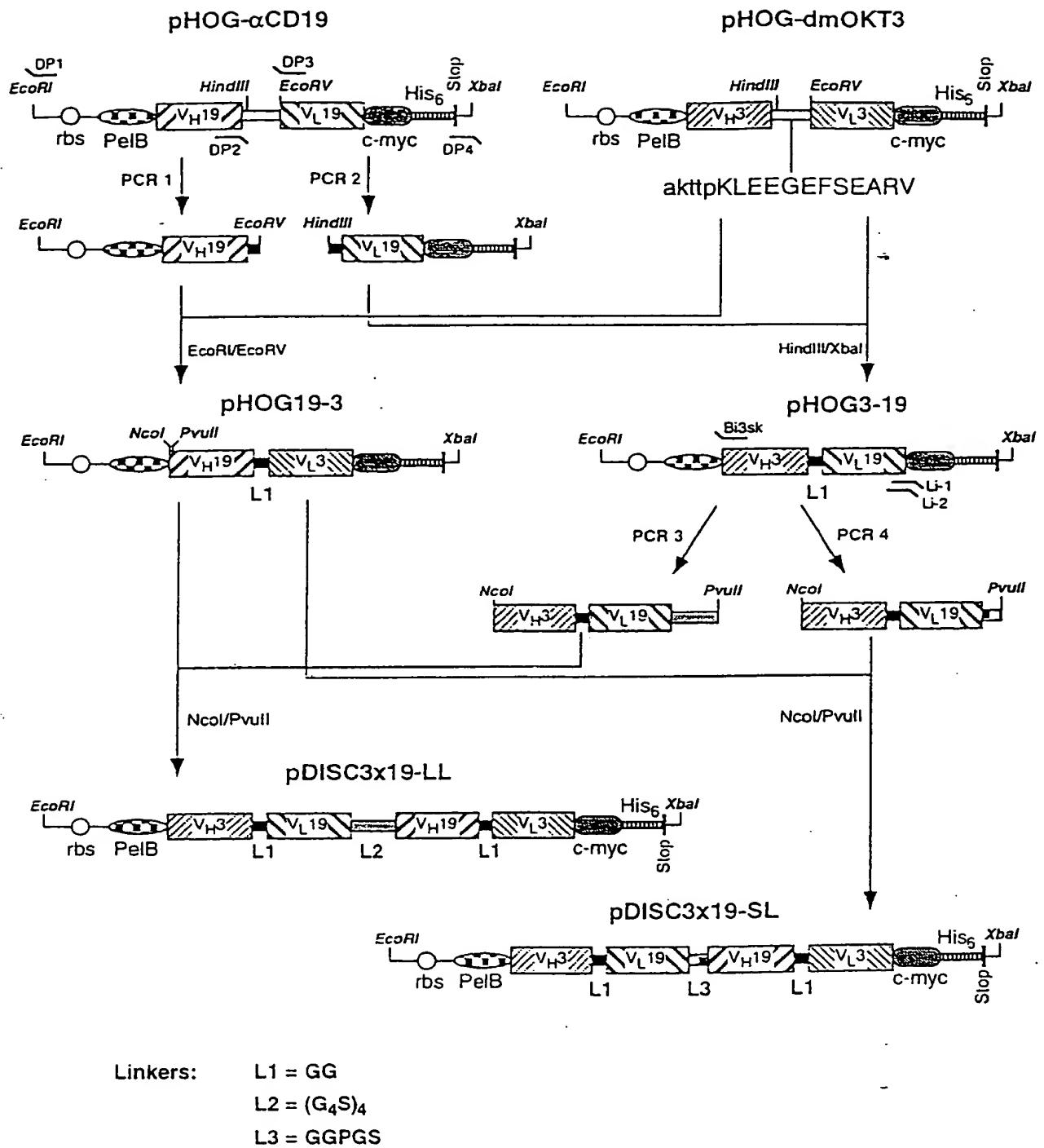


FIGURE 2

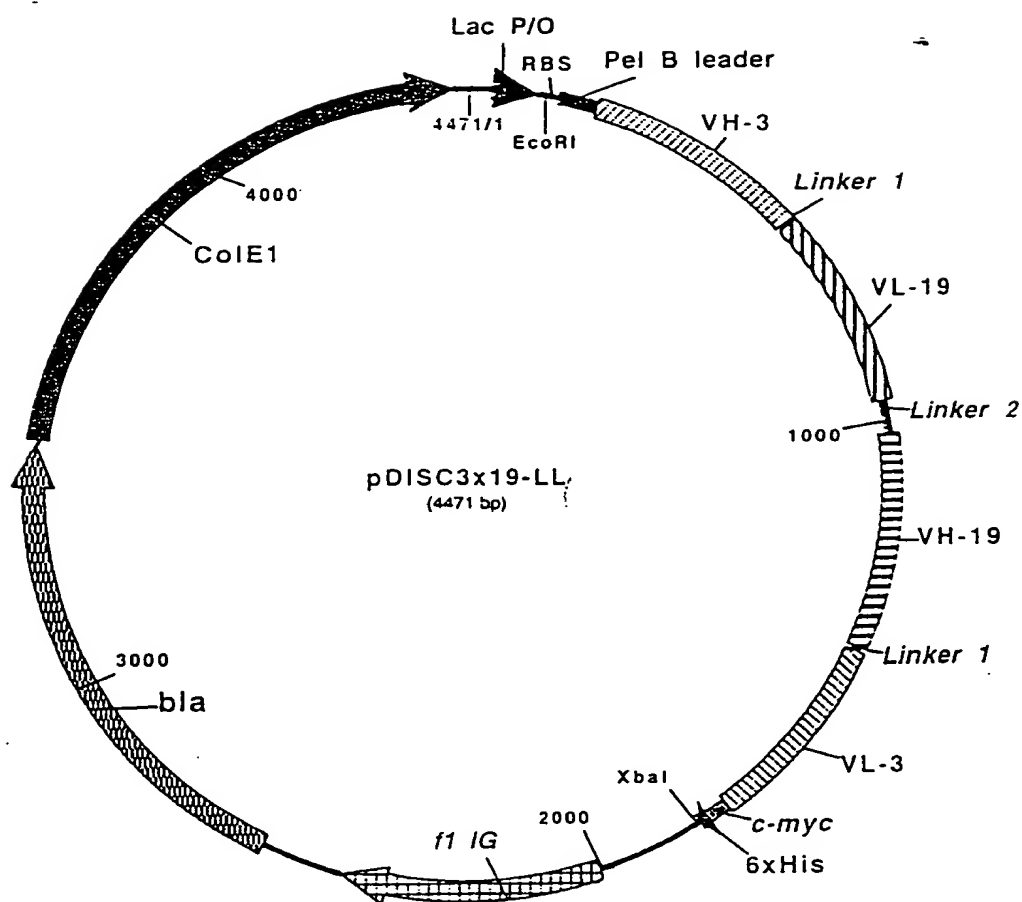


FIGURE 3

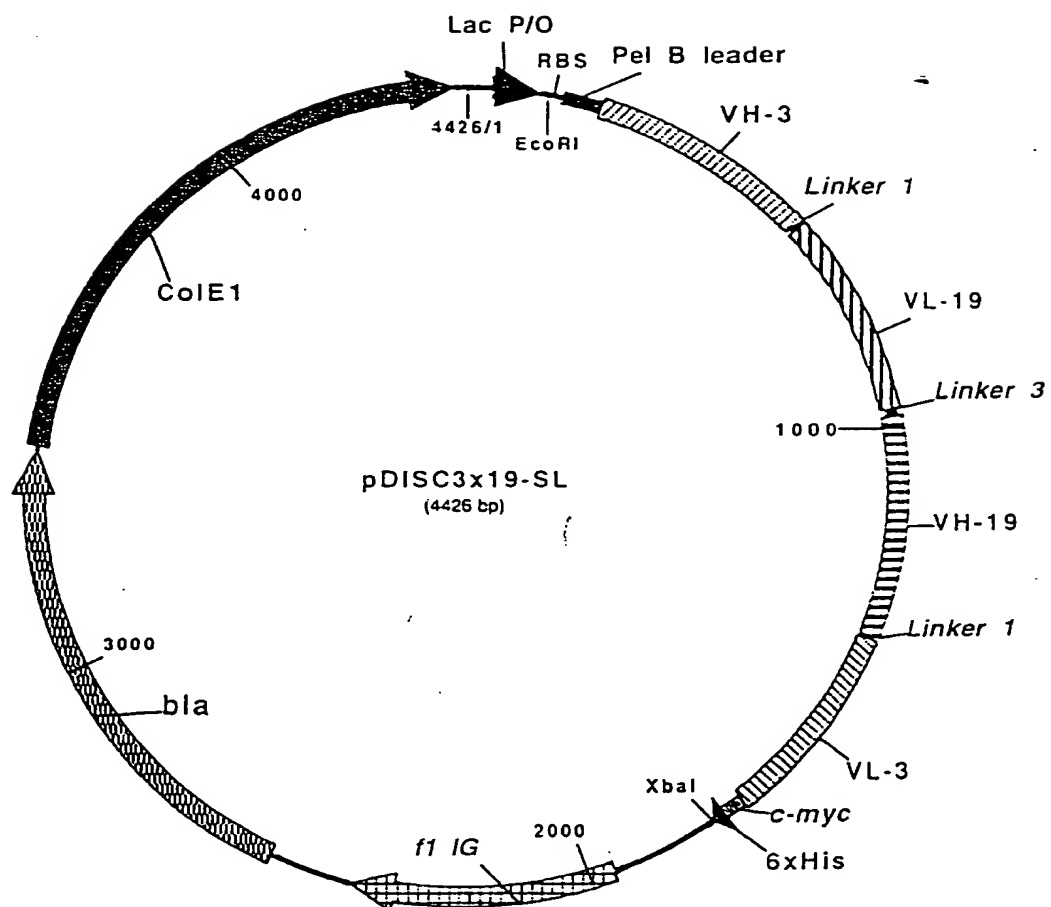


FIGURE 4

FIGURE 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI

1 GAATTCATTAAAGGGGAATTAACCATGAAATACCTATTGGCTACGGCAGCCGCTGGGTTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG

13 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC

223 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAACACAGGCGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC

523 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E N I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

257 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAGGGCCATTCACACCAATCTCCAGCAGCGCTACATGCACTGAGCAGCCTGAC

803 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGTATTATGATGATCATTACAGCCCTTGACTACTGGGGCCAGCAGCCTCTCA

1093 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCAGCTTAAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCAGCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGA

1333 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L S Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCGCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACGATTTCAGGAC

1583 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I F G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCTCTATCTATGATGCAATCTAGTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGCTT

1953 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCCCTCAACATCCATCTCTGCGAGAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTCTCAGCAAAGTACTGAGGATCCCTGGACCTCTCGTGA

2253 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAAGGCTGCTGGCGCGCTGGTGGCCCAAGGTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCT

2553 G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCTCTGGGCTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTCTGGCTATGCATTGAGTACCTAGCTAGCTGGATGAACTGGGTGAGCAGGAC

2843 V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGGCTGGAGATGGTGATACCTAACTACAAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC

3143 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACCAATCTCTCAGCAGCCTACATGCACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGGGCTCTATTTCTGTGCAAGAC

3423 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGCTCTCTGAGCAGCAAA

3723 R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAGACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGCTCTGCACTCTCAGGGGAGAGGTCACTGACCTGCA

4003 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAGTGGTACAGCAGAACTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAA

4303 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGGCTCTGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGGGGATGGAGGCTGAAGTGC

4583 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TGCCACTTATTACTGCCAGTGGAGTAGTAACCCATTACCGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAGGGGCTGCTACTGC

4883 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAATCGGATTCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCAGCTCCGATCCGATCACTAATCTAGA

5173 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H

FIGURE 6

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCTCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGTGAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAACGGGATTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

EcoRI

Xhol

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA~~AAAAGAGAGCGCTGAAGCTGAATTC~~CAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGA^{ACT}TGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGURE 7

941 ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC

1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCCGATG

25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT

50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG

75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT

99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGURE 8



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 19 846.9

Anmeldetag: 5. Mai 1998

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Multivalente Antikörper-Konstrukte

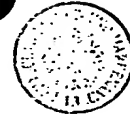
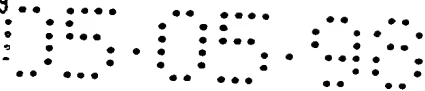
IPC: C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Februar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

6. Mai 1998

+49 89 42724749



Anmelderin: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2534 - hu / A

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v -Antikörper-Konstrukte, sie codierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H - und zwei V_L -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H - und einer V_L -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Um Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen konstante Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch variable Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

In der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 2 -

Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des Weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes, F_v -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Dieses wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit

5. Mai 1998

+49 8 724749

05.05.98

- 3. -

sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH_2 -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

5. Mai 1998

+49 911 2724749

05.05.98

- 4 -

Ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " F_v -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-SC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:
ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt, und/oder
ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

In den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereit, indem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 5 -

bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

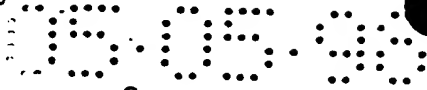
Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); Rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /ac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; Rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

5. Mai 1998

+49 42724749



- 6 -

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -paare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_v -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_v -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz codiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem

5. Mai 1998

+49 89 42724749



- 7 -

Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v -Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG- α CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* **196**, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* **10**, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer #1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und #2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und mit dem mit *EcoRI/EcoRV* linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Histidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 8 -

AGCACACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTT-TAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCAC-CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCGCAGAACCAACCACCACC-AGCGGCCGCGAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄S-er)₄-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCGAGCATCAGCC-CG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Nco*I/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Nco*I/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

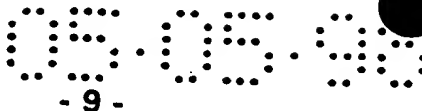
Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

a) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker,

6. Mai 1988

+49 2724749



Zeoцин™, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXbN 5'-GGTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *XbaI* gespalten und in mit *EcoRI/XbaI* linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit *EcoRI* gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *XbaI* gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *NcoI* gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *XbaI* wurde ein kleines Fragment, umfassend das für den bivalenten F_v-Antikörper kodierende Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 10 -

Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaффinitätschromatographie (MAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest

5. Mai 1998

+49 42724749

05.05.98
- 11 -

(1976, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad (München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v -Antikörper-Konstrukte wurden aus den A_{280} -Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1,96$ bzw. $1,93$ bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *SacI* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die $100 \mu\text{g/ml}$ ZeocinTM enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v -Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, smaning, Deutschland) selektiert.

Für Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v -Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

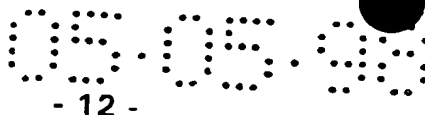
Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v -Antikörper-Konstruktes

a) Größenausschlußchromatographie

Die analytische Gelfiltration der F_v -Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter

5. Mai 1998

+48 42724749



- 12 -

Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 μ l/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zell-Linie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 μ l RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 μ l der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 μ l 10 μ g/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 μ l des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 μ l 1 μ g/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME

5. Mai 1998

+4 42724749

05.05.98
- 13 -

supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard ^{61}Cr -Freisetzungstests bewertet; 2×10^6 Zielzellen wurden mit $200 \mu\text{Ci Na}^{61}\text{CrO}_4$ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von $2 \times 10^5/\text{ml}$ resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in $100 \mu\text{l}$ wurden auf 10^4 Zielzellen/Vertiefung in $50 \mu\text{l}$ titriert. $50 \mu\text{l}$ Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. $100 \mu\text{l}$ des Überstands wurden gewonnen und auf ^{61}Cr -Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: $(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (-\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100$.

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 14 -

K 2534

Patentansprüche

1. Multivalentes F_V -Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 - 10 Aminosäuren aufweisen.
3. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
4. F_V -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_V -Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
5. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.
6. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$ aufweist.
7. F_V -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_V -Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
8. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.
9. F_V -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

5. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 15 -

10. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
6. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
7. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
8. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
9. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
10. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

6. Mai 1998

+49 89 42724749

05.05.98

- 16 -

K 2534

Zusammenfassung

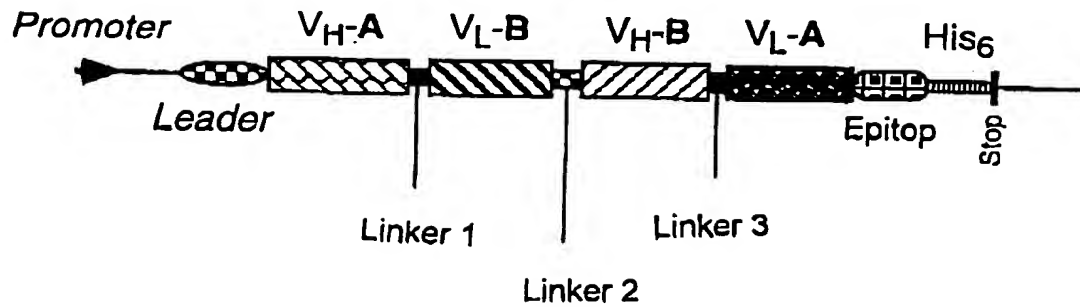
Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v -Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

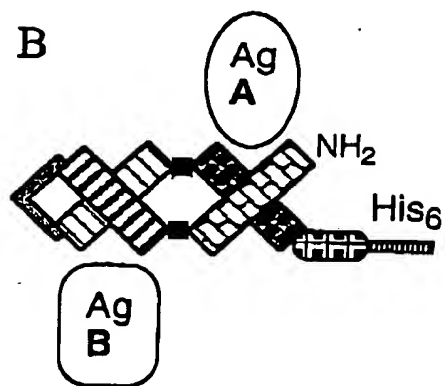
+49 89 42724749

05.05.99
1/8

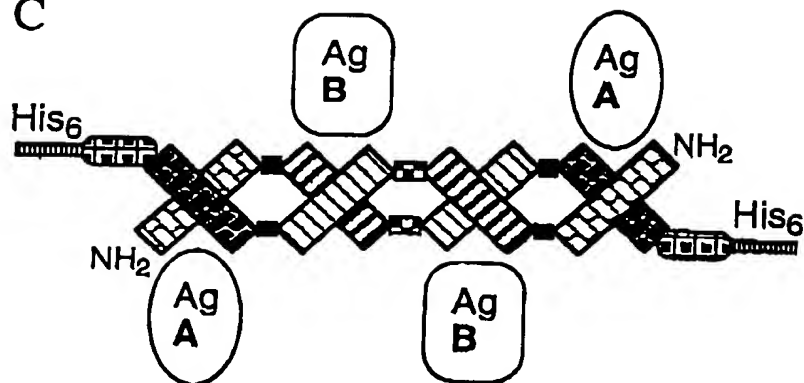
A



B



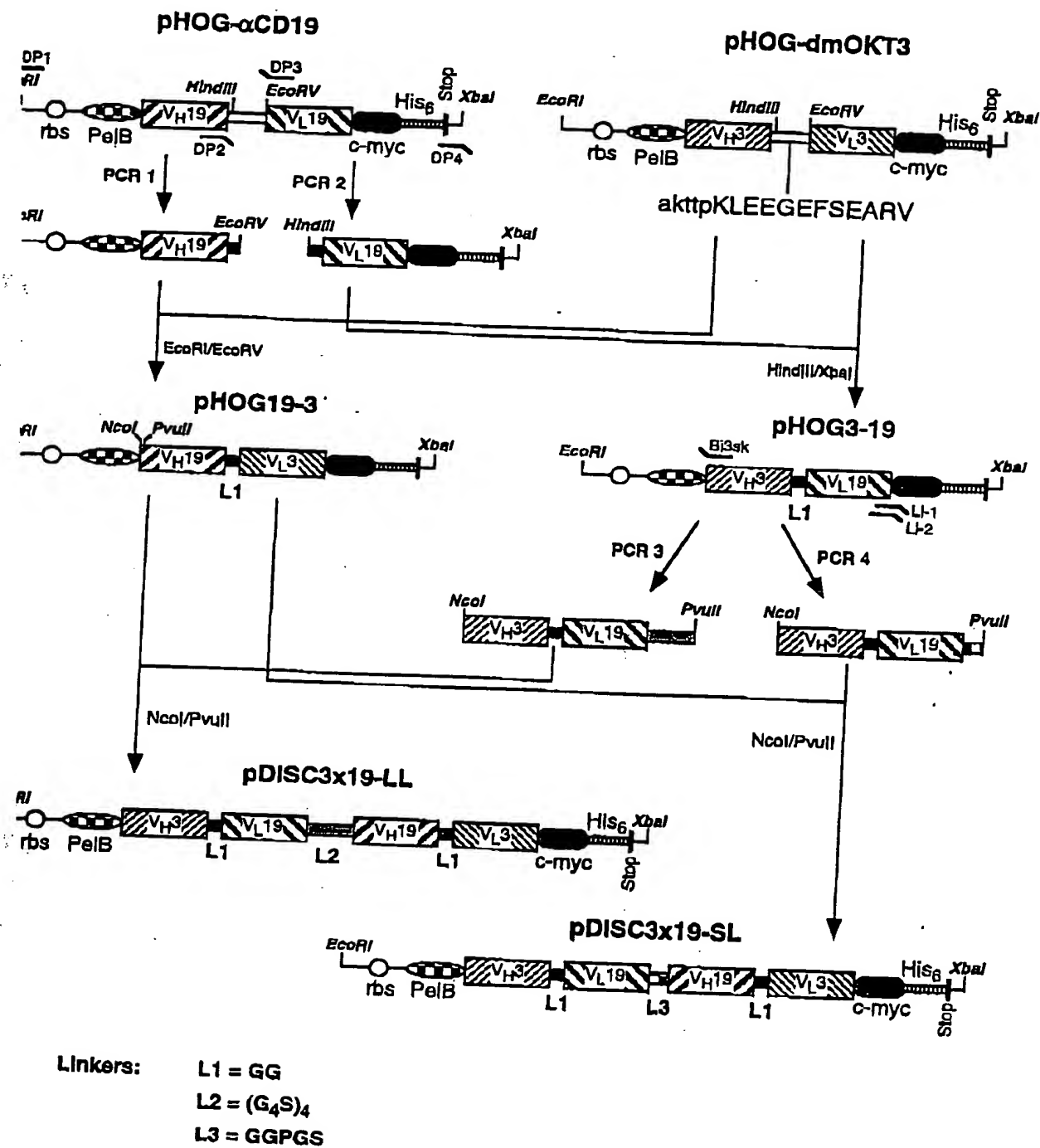
C



FIGUR 1

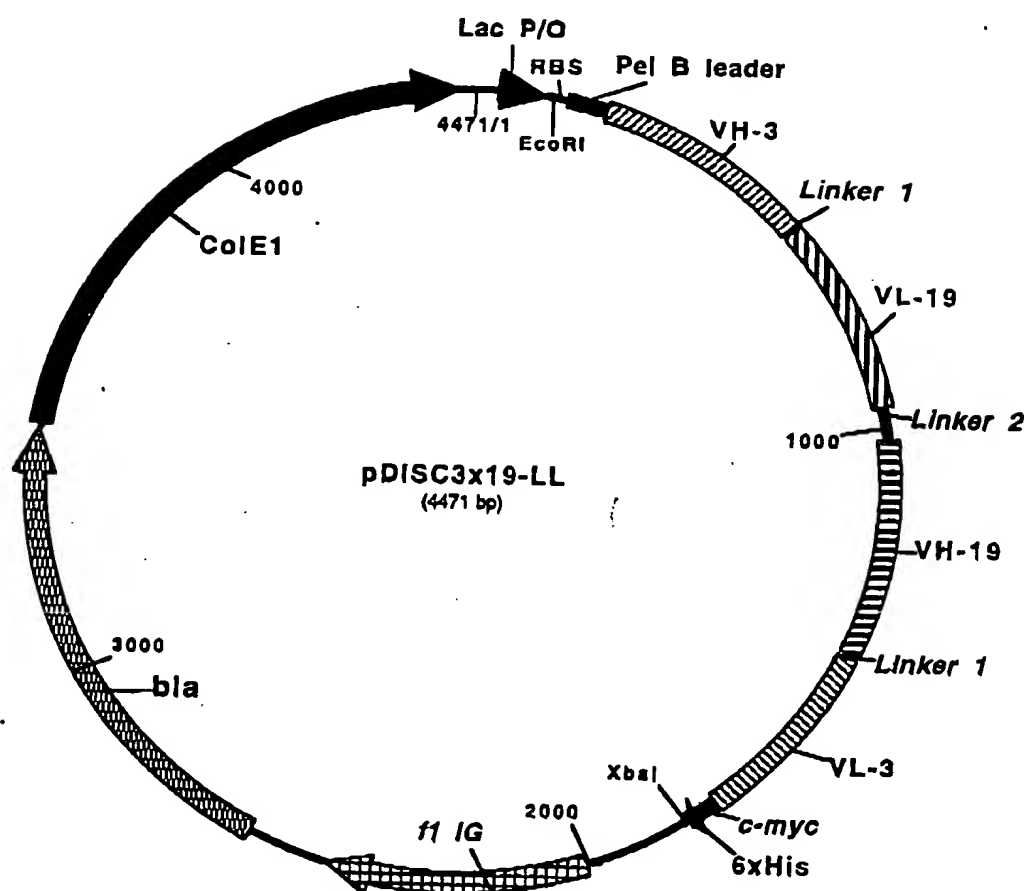
+49 89 42724749

02/8 05 98



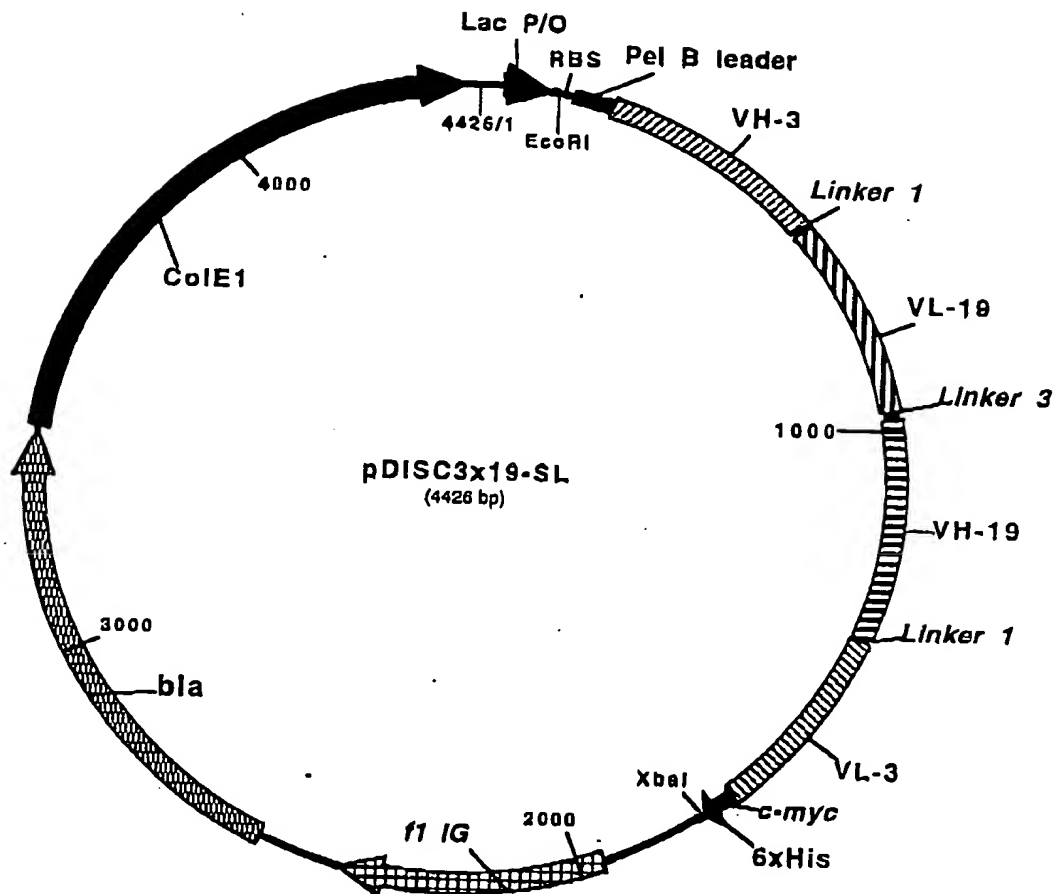
FIGUR 2

+49 89 42724749

05.05.98
9/8

FIGUR 3

+4 42724749

05.05.98
4/8

FIGUR 4

+49 20 42724749

5/8

EcoRI RBS PstI leader NcoI

1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAATACTTATCGCTAAGGCAGCCGGCTGGCTGTCTGCTGCGCAGCTCAGCGGCCCATGG

92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGGCTCAGTGAAGATOTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC

22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

13 TAGGTACACGATGCACTGGGTAAGACAGAGCGCTGGACAGGGCTCTGGAATGGATTGGATACATAATCTTAGCGGTGGTTATAC

12 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

17 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCTTACATGCAACTGAGCAGCGCTGAC

10 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

4 ATCTGAGGACTCTGCACTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGCCAAGGCCACCCTCTCA

9 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1

0 CAGTCTCTCAGCCCAAACACCCCAGCTTGGCGGCTGATATCTTGCTACCCAAAATCCAGCTTCTTTGGCTGTCTCTAGGCCAGA

8 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

0 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGTATAGTTATTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC

8 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

1 AGCCACCCAACTCTCTATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTTCTGGGATCCCCAGGTTTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

5 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

1 CACCCTCAACATCCATCTCTGTGCGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTTCAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGA

1 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI

1 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATCTGGGGCGGCTGGTGGTCTGTGCTGCGGGCGGCTAGCGGTGGTGGCGGG

1 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G S G G G G

PvuII Frame-H1

1 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGCTGAGGCGTGGGTCTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGG

1 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A R L V R P G S S V K I S C K

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

1 CTCTGCTATGCAATTCAGTACTGCTAGTGAAGCTGGGTGAAGCAGAGCGCTGGACAGGGCTCTGAGTGGATTGGACAGATTGQGC

1 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W

PstI Frame-H3

1 CTGGAGATGGTGATATACTAAGTGAAGAGTTCAAGGGTAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCGCTACA

1 P G D G D T N Y N G K F X G K A T L T A D E S S S T A Y

CDR-H3

1 TGCAACTCAGCAGCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTAT

1 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y

Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1

1 GCTATGGACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCCCAAACACCCCAGCTTGGCGGCTGATATCTGCTCACTC

1 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T

VL anti-CD3 CDR-L1

1 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCACTCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGCACTGAGTGGCCAGCTCAAGTGTAAATTAGATGAAGTGG

1 Q S P A I M S A S P G E K V T H T C S A S S S V S Y M N W

Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3

1 TACCAGCAAGATCAGGCACCTCCCCCAAAGAATGGATTATGACAGATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA

1 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G

CDR-L3

1 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGCGTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGGAGTAGTAA

1 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N

Frame-L4 C kappa c-myc epsilon

1 FCCATTCACTGCTGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGCTGATCTGCACCAACTGGATCCCAACAAAAGCTGATCTCAG

1 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S R Q K L I S

HleIII XbaI

1 AAGAAGACCTAAACTCAGTACCATCACCATTCAATCTAGA

1 E E D L N S H H H H H .

FIGUR 5

+4 0 42724749

05.05.98
6/8

EcoRI RBS PstI leader NcoI
1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCTACGGCAGCGCTGGCTTGTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG
120 M K Y L L P T A A G L L L L A A Q P A M
92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTCTGCAAGGCTTCTGGGTACACCTTTAC
222 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
183 TAGGTACAGGATGCAGCTGGGTAAACACAGGCGCTGGACAGGGCTCTGGAATGGATGGATACATTAACTCTAGCCGTGGTTATAC
522 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
Frame-H3
267 TAATTACATCAGAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCGCTGAC
802 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
CDR-H3 Frame-H4
354 ATCTGAGGACTCTGCACTCTATTACTGTGCAAGATATTTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAGGCCACCACTCTCA
1092 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L
CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
440 CAGTCTCTCTCAGCCAAACCAACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTGTCTCAGCCAAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTCTCTAGGGCAGA
1382 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
CDR-L1 Frame-L2
530 GGGCCACCATCTCTCTGCAAGGCCAGCCCAAGTGTGATTATGATGGTGTATGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
1682 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
CDR-L2 Frame-L3
614 AGCCACCCAACTCTCTCATCTATGATGATCCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCAAGCTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
1962 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R P S G S G S G T D F
CDR-L3 Frame-L4
702 CACCTCAACATCCATCTCTGTGAGAGAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTCAGCAGAGTACTGAGGATCCCTGGAGCTTCCGTGGG
2252 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1
790 GGCACCAAGCTGCAAAATCAACCGCTGATGCTGGCGCCCTGGTGGCCAGGGTCCAGGTGCAAGCTGCAAGCTCTGGGGCTGAGCT
2552 G T K L E I K R A D A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L
VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2
879 GGTGAGGCTGGGTCTCTCAGTGAAGATTTCTCTGCAAGCTTCTGGGTATGCAATTCAGTACTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGC
2842 V R P G S S V K I S C K A S G Y A P S S Y W M N W V K Q R
CDR-H2
968 CTGGACAGGCTCTTGTAGTGGATTGGACAGATTGGGCTGGAGATGGTGTATCTAATACTACAATGCAAGTTCAGGGGTAAAGCC
3142 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A
Frame-H3
051 ACTCTGACTGCAGACCAATCTCTCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGGGCTCTATTCTGTGCAAGAC
3422 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R
CDR-H3 Frame-H4 CH1
142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCAAGCTCTCTCAGCCAAAC
1722 R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K
Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3
126 CAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTGTCTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGCAGAAGGTCAACATGACCTGCA
1002 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2
116 GTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAAGTGGTACAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAA
302 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K
Frame-L3
01 ACTGGGTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC
582 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A
CDR-L3 Frame-L4 C kappa
91 TGCCACTTATTACTGCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTTCACGTTCCGGCTCCGGGACAAAGTTGGAATAAACCAGGCTGATCTGC
882 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A
c-myc epitope His6 tag XbaI
78 ACCAAGTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAGAAAGAGACCTAAACTCAGATCAGCAATCAGCAATCAATCTAGA
172 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H

FIGUR 6

+49 89 42724749

05 05 00
778

ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

AACAGAAGATGAAACGGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCAATTGCT
V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

6/9

1 ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

5 AACAGAAGATGAAACGGCCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
5▶ T E D E T A G I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

9 TTGCTGTTTTGCCATTTCACACACACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
9▶ V A V L P F S N S I N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTGCAAAAGCAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
1▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

5 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
1▶ Q S G A E L A H P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8